

ISTRUZIONI PER L'USO

16, 32, 48 E 96 CAMPIONI

SOPHiA DDM™ Dx **Myeloid Solution**



Per uso diagnostico in vitro (IVD)
Non per l'autotest



SINTESI DELLE INFORMAZIONI

Nome prodotto	SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution
Tipo di prodotto	Soluzione bundle
Famiglia di prodotti	Applicazione di diagnostica molecolare (kit + analisi)
ID algoritmo	ILL1XG1S9_CNV
ID pannello geni	MYS_v1
Versione del prodotto	1,0
Tipo di campione	DNA somatico isolato dal sangue
Sequenziatore	Illumina - MiSeq
Descrizione GMDN	Kit di reagenti per IVD / Software interpretativo di analisi genomica umana
ID documento	SG-00682
Versione del documento	v6.0
Data di revisione	27 gennaio 2026

Queste Istruzioni per l'uso (IFU) sono applicabili a tutte le versioni di SOPHiA DDM™ Dx.
Si prega di leggere attentamente le IFU prima di utilizzare questo prodotto.



SOPHiA GENETICS SA
ZA La Pièce 12
1180 Rolle
Switzerland



BS0103ILLCSML01-016
BS0103ILLCSML01-032
BS0103ILLCSML01-048
BS0103ILLCSML01-96



SOPHiA GENETICS SAS
Technopole Izarbel
158 allée Fauste d'Elhuyar
F-64210 Bidart, France





CODICI DEI PRODOTTI

	CODICE PRODOTTO COMPLETO	BOX 1	BOX 2	KIT PREPARAZIONE LIBRERIA
REF	BS0103ILLCSML01-016	B1.01.0003.C-16	B2.0003.C-16	700232
	BS0103ILLCSML01-032	B1.01.0003.C-32	B2.0003.C-32	700232
	BS0103ILLCSML01-048	B1.01.0003.C-48	B2.0003.C-48	700234
	BS0103ILLCSML01-96	B1.01.0003.C-96	B2.0003.C-48	700234



ESONERO DA RESPONSABILITÀ

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di SOPHiA GENETICS SA e delle sue affiliate ("SOPHiA GENETICS") e sono destinati esclusivamente all'uso contrattuale da parte del cliente in relazione all'uso del prodotto o dei prodotti qui descritti e per nessun'altra finalità. Questo documento e i suoi contenuti non devono essere utilizzati né distribuiti per qualsiasi altra finalità e/o altrimenti comunicati, divulgati o riprodotti, o citati come riferimento in qualsiasi modo senza il previo consenso scritto di SOPHiA GENETICS.

SOPHiA GENETICS non trasferisce alcuna licenza con i suoi diritti di brevetto, marchio commerciale, copyright o common law né diritti simili di terze parti con il presente documento. Le istruzioni contenute in questo documento devono essere rigorosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente addestrato per garantire l'uso corretto e sicuro del prodotto o dei prodotti qui descritti. Prima di utilizzare questi prodotti, tutto il contenuto del presente documento deve essere completamente letto e compreso.

LA MANCATA LETTURA COMPLETA E L'ESPLICITA OSSERVANZA DI TUTTE LE ISTRUZIONI CONTENUTE NEL PRESENTE DOCUMENTO POSSONO PROVOCARE DANNI AI PRODOTTI, LESIONI A PERSONE, COMPRESI GLI UTENTI O TERZI, E DANNI AD ALTRE PROPRIETÀ.

SOPHiA GENETICS NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO SCORRETTO DEI PRODOTTI DESCRITTI NEL PRESENTE DOCUMENTO (COMPRESI PARTI DI ESSO O IL RELATIVO SOFTWARE).

MARCHI COMMERCIALI

Illumina® e MiSeq® sono marchi registrati di Illumina, Inc.

AMPure® e Agencourt® sono marchi registrati di Beckman Coulter, Inc.

Qubit® e Dynabeads® sono marchi registrati di Thermo Fisher Scientific Inc.

KAPA™ è un marchio commerciale di Roche.

QIAseq® è un marchio registrato di Qiagen.

SOPHiA GENETICS™ e SOPHiA DDM™ Dx sono marchi di SOPHiA GENETICS SA e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, logo e altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari. SALVO OVE APPOSITAMENTE SPECIFICATO, L'USO DA PARTE DI SOPHiA GENETICS DI MARCHI COMMERCIALI DI TERZE PARTI NON INDICA ALCUN RAPPORTO, SPONSORIZZAZIONE O APPROVAZIONE TRA SOPHiA GENETICS E I TITOLARI DI QUESTI MARCHI COMMERCIALI. Qualsiasi riferimento da parte di SOPHiA GENETICS a marchi di terze parti ha lo scopo di identificare i corrispondenti beni e/o servizi di terze parti e viene considerato "uso corretto di nominativi" secondo quanto disposto dalla legge sui marchi commerciali.



CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
SG-00682 – 6.0	27 gennaio 2026	SG-00659 – 8.0	- Modifica al sistema di numerazione delle versioni, nessuna versione aggiuntiva tra la versione 5.5 e la versione 6.0. - Aggiunta una nuova colonna nella tabella della cronologia delle revisioni per tenere traccia della versione inglese corrispondente; la colonna è vuota per tutte le revisioni precedenti. - Sezione 2: rimozione delle indicazioni patologiche; aggiornamento del nome del componente di preparazione delle librerie. - Sezione 3: rimozione dei componenti che esulano dall'ambito trattato, dell'app desktop SOPHiA DDM dalla descrizione. - Avvertenze e Precauzioni: aggiunta del numero di identificazione CAS e della concentrazione di ciascun componente pericoloso elencato. - Rimozione delle limitazioni che esulano dall'ambito trattato. - Rimozione delle istruzioni che esulano dall'ambito trattato dalla sezione Componenti del prodotto. - Rimozione della sezione Sintesi e spiegazione del test.
SG-00682 – 5.5	23 maggio 25		- Appendice 1: rimossa la tabella "16 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)" dall'Appendice I a causa dell'eliminazione del formato piastra da 16 adattatori a doppio indice. - Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1: aggiornato con la modifica di cui sopra.
SG-00682 – 5.4	19 marzo 25		Sezione 5.1.1 Contenuto del kit - BOX 1: aumento del volume del contenuto del tampone di ibridazione 2x da 50 µl a 75 µl; aumento del volume del contenuto del potenziatore per tamponi di ibridazione da 20 µl a 30 µl.
SG-00682 – 5.3	14 agosto 24		"App Web SOPHiA DDM™" è cambiato in "Modalità SOPHiA DDM™ Dx" - Riformulazioni minori relative alla modifica di cui sopra
SG-00682 – 5.2	08 luglio 24		- Aggiornato l'indirizzo della REP CE - Riduzione del volume del contenuto delle sonde di ibridazione SOPHiA GENETICS da 20 µl a 18 µl (vedere la sezione 5.1.1 <i>Contenuto del kit - BOX 1</i>)



ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
			Rimozione la proprietà intellettuale del fornitore di terze parti dalle sezioni 5.1.1 <i>Contenuto del kit</i>, 5.3.1 <i>Pooling di librerie</i> e 5.3.2 <i>Ibridazione</i>
SG-00682 – 5.1	9 gen. 23		Correzione degli errori di formattazione
SG-00682 – 5.0	14 set 22		- Aggiunta del simbolo del marchio commerciale SOPHiA DDM e SOPHiA GENETICS. - Nome del kit preparazione libreria modificato in SOPHiA GENETICS™ Dx ovunque. - Versione del documento aggiornata al numero intero successivo senza decimali.
SG-00682 – 4.5	19 apr. 22		Aggiunte istruzioni per l'applicazione web SOPHiA DDM™
SG-00158 - 4.4	14 apr. 22		- Limitazioni e avvertenze: modificate - Indirizzo dell'ufficio di SOPHiA GENETICS aggiornato - Modifiche Wet Lab come raccomandato globalmente - Piccole modifiche e correzioni di refusi
ID-60101-17 - 4.3	21 lug. 21		- Pagina 2 - ID documento corretto. - Pagine 2, 29 - Modifiche estetiche. - Pagina 17 - Ordine dei passaggi modificato. - Pagina 26 - Volume pre-mix PCR "da 48 campioni" corretto.
ID-60101-17 - 4.2	16 giu. 21		- Pagina 3 - Marchio commerciale modificato. - Pagina 44 - Piccola aggiunta nelle specifiche del file. - Pagine 55, 56 - Refuso "Unico" nell'intestazione rimosso.
ID-60101-17 - 4.1	28 mag. 21		- Pagina 2 - Tabella delle informazioni riepilogative modificata. - Pagina 3 - Esonero da responsabilità modificato. - Pagine 11, 13, 15, 29 - Intestazione della tabella modificata. - Pagina 16 - Passaggi 1 e 2 della sequenza scambiati. - Pagina 17 - Preparazione dell'etanolo spostata in "Preparazione". - Pagine 12, 18, 19, 21, 22, 23, 27, 35, 36, 37, 38, 43 - Modifiche estetiche e refusi. - Pagina 20 - Punto 1, punto elenco 2 - cambiato "Potenziatore FX" in "pre-mix reazione FX Reaction". - Pagina 47 - Punti elenco 2 e 18 aggiunti, punto 19 modificato.
ID-60101-17 - 4.0	30 mar. 21		- Pagina del titolo, logo aziendale, intestazione, piè di pagina, ultima pagina. - Argomenti riorganizzati.



ID DOCUMENTO/ VERSIONE	DATA	Versione equivalente delle istruzioni per l'uso in inglese	DESCRIZIONE DELLA MODIFICA
			• Include istruzioni di installazione, caricamento e convenzione di denominazione dell'app web SOPHiA DDM™. • Combinare le "Istruzioni per l'uso" di quattro formati di kit per poter includere numeri di campioni diversi. Include le tabelle e apportate le opportune modifiche, se e quando necessario. • Sono stati combinati i documenti "Istruzioni per l'uso" dei seguenti kit: - PM_CEIVD_B2.1.1.14_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.16_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.18_r2en - PM_CEIVD_B2.1.1.24_r1en • Piccole modifiche per chiarezza nelle sezioni seguenti: • Sezione 5.3.1 Pooling della libreria • Sezione 5.3.5 Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato



SOMMARIO

1. Uso/finalità previsti.....	10
2. Dichiarazione generale dei principi di prova / procedurali	11
3. Componenti del prodotto	12
4. Materiali e metodi del kit.....	13
4.1. Considerazioni iniziali	13
4.1.1. Contenuto del kit (16, 32, 48 o 96 campioni).....	13
4.1.2. Avvertenze e precauzioni	15
4.1.3. Materiale richiesto (non fornito)	17
4.2. Preparazione libreria	18
4.2.1. Preparazione del DNA genomico	18
4.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti	19
4.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing.....	21
4.2.4. Legatura	22
4.2.5. Pulizia post-legatura.....	23
4.2.6. Selezione dimensione doppia	24
4.2.7. Amplificazione della libreria	25
4.2.8. Pulizia post-amplificazione.....	27
4.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità	28
4.3. Cattura	29
4.3.1. Pooling della libreria.....	29
4.3.2. Ibridazione.....	30
4.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina	32
4.3.4. Legame di target ibridati alle sfere.....	33
4.3.5. Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato	33
4.3.6. Amplificazione post-cattura.....	35
4.3.7. Pulizia post-cattura dell'amplificazione.....	36
4.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità	37
4.4. Sequenziamento	38
4.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento	38
5. Procedura di analisi	39
5.1. Istruzioni per l'installazione della modalità SOPHiA DDM™ Dx	39
5.2. Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la generazione di risultati IVD	39
6. Limitazioni, avvertenze e precauzioni	40
7. Valutazione della performance non cliniche	43
7.1. METODI	43
7.2. DATI	45
7.3. CONCLUSIONI GENERALI	45
7.4. RISULTATI	47



8. Simboli48

9. Supporto49

Appendice 1. Piastre adattatrici a doppio indice50

Appendice 2. Attrezzatura di laboratorio usata nel laboratorio di SOPHiA GENETICS53

Appendice 3. Flusso di lavoro generale – SOPHiA DDM™ Capture Solutions55

Appendice 4. Elenco delle regioni target e delle regioni segnalate applicabili57



1. USO/FINALITÀ PREVISTI

Il prodotto viene utilizzato per identificare le varianti che si verificano in 30 geni coinvolti nelle neoplasie mieloidi puntando a specifiche posizioni soggette a mutazioni all'interno della sequenza genomica. Il prodotto è stato ideato come ausilio per gli operatori sanitari per prendere una decisione clinica relativa alle neoplasie mieloidi, e per fornire un razionale molecolare per una terapia appropriata.

Il prodotto è destinato esclusivamente all'uso diagnostico in vitro e all'uso professionale.



2. DICHIARAZIONE GENERALE DEI PRINCIPI DI PROVA / PROCEDURALI

La funzione convalidata di analisi di SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution (MYS) consiste nell'analizzare i dati NGS grezzi generati da uno strumento Illumina MiSeq® con il kit di reagenti MiSeq® Reagent Kit v3, su campioni somatici isolati dal sangue con KAPA® Library Amplification Kit e SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I.

SOPHiA DDM™ Dx MYS si basa su tre passaggi principali. Il primo passaggio è la qualificazione del campione di DNA ematico che può essere utilizzato per il test. Il secondo consiste nel preparare manualmente i campioni per il sequenziamento, un'operazione nota come preparazione della libreria. La preparazione della libreria si compone di sette passaggi principali: frammentazione del DNA, legatura degli adattatori, amplificazione PCR delle singole librerie, pooling delle librerie, ibridazione delle sonde, cattura e amplificazione PCR post-cattura. La terza fase è il sequenziamento del campione preparato usando la chimica SBS (sequenziamento per sintesi) sul sequenziatore Illumina MiSeq®.

Per condurre l'analisi, i risultati devono essere caricati sulla piattaforma SOPHiA DDM™ e analizzati utilizzando l'applicazione SOPHiA DDM™ Dx MYS.

Tabella 1: Elenco dei geni bersagliati dal prodotto

ABL1	FLT3	PTPN11
ASXL1	HRAS	RUNX1
BRAF	IDH1	SETBP1
CALR	IDH2	SF3B1
CBL	JAK2	SRSF2
CEBP α	KIT	TET2
CSF3R	KRAS	TP53
DNMT3A	MPL	U2AF1
ETV6	NPM1	WT1
EZH2	NRAS	ZRSR2



3. COMPONENTI DEL PRODOTTO

SOPHiA DDM™ Dx MYS è costituito da due componenti: il kit NGS e la pipeline bioinformatica utilizzata in combinazione con un accessorio IVD, la modalità SOPHiA DDM™ Dx basata su cloud.

- Lo scopo del kit NGS è preparare e arricchire le librerie di DNA da campioni di sangue adatti al sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq®. Il kit NGS consente di generare dati di sequenziamento mirati. Gli elementi sono descritti nella seguente sezione 5. Materiali e metodi del kit – 5.1. Considerazioni iniziali - 5.1.1 Contenuto del kit.
- La pipeline bioinformatica ("pipeline MYS") processa i dati grezzi NGS mediante algoritmi in grado di valutare l'integrità genomica.
- La modalità SOPHiA DDM™ Dx è un'applicazione front-end basata sul web, disponibile come "software-as-a-service" (SaaS), utilizzata per generare un rapporto scaricabile per i geni menzionati nella Tabella 1 per SNV e INDEL. Si applicano limitazioni - si rimanda alla sezione 7 - Limitazioni, avvertenze e precauzioni.



4. MATERIALI E METODI DEL KIT

4.1. Considerazioni iniziali

Per una prestazione ottimale del kit, assicurarsi che tutte le provette siano fisicamente intatte e conservate alle temperature raccomandate, al momento della ricezione. La manipolazione scorretta e lo stoccaggio dei componenti del kit in condizioni diverse possono influenzare negativamente le prestazioni del kit.

4.1.1. Contenuto del kit (16, 32, 48 o 96 campioni)

Centrifugare sempre brevemente le provette prima dell'uso per raccogliere tutto il liquido.

A seconda del formato del kit, vengono forniti i seguenti componenti:

COMPONENTE	NUMERO DI ARTICOLI A SECONDA DEL FORMATO DEL KIT			
	Kit da 16 campioni	Kit da 32 campioni	Kit da 48 campioni	Kit da 96 campioni
BOX 1	1	1	1	2 (48 campioni ciascuno)
Adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® (in formato piastra a 96 pozzetti inclusi nella Box 1)	32	32	48	96 (Piastra contenuta in una delle due Box 1)
BOX 2	1	1	1	2 (48 campioni ciascuno)
SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I	1	2 (16 campioni ciascuno)	1	2 (48 campioni ciascuno)

BOX 1 (CONSERVARE TRA -25 °C E -15 °C)

- Universal Blockers - TS Mix (12 µl)
- Human Cot DNA (25 µl)
- Myeloid Solution probes by SOPHiA GENETICS (18 µl)
- 2x Hybridization Buffer (75 µl)
- Hybridization Buffer Enhancer (30 µl)
- 2X Bead Wash Buffer (1250 µl)
- 10X Stringent Wash Buffer (200 µl)
- 10X Wash Buffer I (160 µl)
- 10X Wash Buffer II (110 µl)
- 10X Wash Buffer III (110 µl)



- A seconda del formato del kit: 32, 48 o 96 adattatori compatibili Illumina® a doppio indice in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno): vedere l'Appendice 1 per la visualizzazione e le sequenze degli adattatori.

BOX 2 (CONSERVARE TRA +2 °C E +8 °C)

- Dynabeads® M-270 Streptavidin (440 µl)
- Agencourt® AMPure® XP (3 x 1,5 ml per 16 campioni, 8,7 ml per 32 campioni e 11,6 ml per 48 campioni, vedere la nota per 96 campioni)
- IDTE Low TE Buffer (10 ml)
- Nuclease-free water (20 ml)

Nota: per 96 campioni, vengono fornite due Box 2 da 48 campioni (vedere la tabella nella pagina precedente).



Importante: fare riferimento alle avvertenze e alle precauzioni qui sotto per ulteriori dettagli.

SOPHiA GENETICS™ DNA LIBRARY PREP KIT I (CONSERVARE TRA -25 °C E -15 °C)

- Per 32 campioni vengono forniti due kit da 16 campioni.
- Per 96 campioni vengono forniti due kit da 48 campioni.

COMPONENTI	FORMATO DEL KIT	
	Kit da 16 campioni	Kit da 48 campioni
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	500	1560
Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® amplificatore librerie) (in µl)	30	95
FX Enzyme Mix (FX Mix enzimi) (in µl)	200	625
FX Buffer (FX tampone) 10x (in µl)	100	315
FX Enhancer (in µl)	100	315
DNA Ligase (DNA ligasi) (in µl)	200	625
DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x (in µl)	400	1250



Importante: fare riferimento alle avvertenze e alle precauzioni qui sotto per ulteriori dettagli.



4.1.2. Avvertenze e precauzioni

Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
2X Tampone di ibridazione	 	• H300 Letale se ingerito. • H311 Tossico per contatto con la pelle. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H370 Provoca danni agli organi. • H370 Provoca danni agli organi (sistema nervoso centrale). • H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. • P264 Lavare accuratamente la pelle contaminata dopo la manipolazione. • P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P301+P310 In caso di ingestione: Contattare immediatamente un centro antiveleni/un medico. • P302+P352 In caso di contatto con la pelle: lavare abbondantemente con acqua. • P308+P311 In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un centro antiveleni o un medico. • P321 Trattamento specifico (vedere il consiglio medico su questa etichetta). • P330 Sciacquare la bocca. • P332+P313 In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. • P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. • P391 Raccogliere il materiale fuoriuscito. • P405 Conservare sotto chiave. • P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Cloruro di ammonio tetrametilico Concentrazione: 49% CAS: 75-57-0
Potenziatore per tamponi di ibridazione		• H351 Sospettato di provocare il cancro. • H360 Può nuocere alla fertilità o al feto. • H373 Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta. • P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. • P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.	Pericolo	Formammide Concentrazione: 100% CAS: 75-12-7



Nome del prodotto	GHS Pittogramma	Frasi H e P	Parole di segnalazione	Componente pericoloso
		• P260 Non respirare i vapori/gli aerosol. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P308+P313 In caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico. • P314 In caso di malessere, consultare un medico. • P405 Conservare sotto chiave. • P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative nazionali.		
10x tampone di lavaggio stringente		• H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H319 Provoca grave irritazione oculare.	Pericolo	Sale sodico dell'acido etilendiamminotetracetico Concentrazione: 2,5% CAS: 6381-92-6
10x tampone di lavaggio I		• H228 Solido infiammabile. • H302 Nocivo se ingerito. • H315 Provoca irritazione cutanea. • H318 Provoca gravi lesioni oculari. • H332 Nocivo se inalato. • H401 Tossico per gli organismi acquatici. • H402 Nocivo per gli organismi acquatici. • H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. • P273 Non disperdere nell'ambiente. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. • P305+P351+P338 In caso di contatto con gli occhi: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. • P310 Chiamare immediatamente un centro antiveleni/un medico. • P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative nazionali.	Pericolo	Dodecilsolfato sodico Concentrazione: 4,9% CAS: 151-21-3
DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x		• H335 Può irritare le vie respiratorie. • P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso/l'udito.	Avvertenza	poli(etilen-glicole) Concentration: 1-5% CAS: 9002-93-1

Usare  e  come dispositivo di protezione individuale.



4.1.3. Materiale richiesto (non fornito)

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE (DA ACQUISTARE SEPARATAMENTE)

- Kit amplificazione libreria KAPA™ KK2620 (Roche N. No: 07958978001)
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml
- Provette da 1,5 ml
- Provette coniche da 50 ml
- Punte filtro
- Etanolo (grado biologia molecolare)
- Reagenti per il sequenziamento Illumina®.

ATTREZZATURA DA LABORATORIO

Per evitare la contaminazione del campione:

- Zona pre-PCR
 - Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
 - Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti
 - Pipette multicanale (P10 o P20; P100; P200)
 - Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)
 - Termociclatore (coperchio riscaldato programmabile)
 - Miscelatore a vortice
- Zona post-PCR
 - Sistema di elettroforesi capillare
 - Concentratore di vuoto DNA
 - Termoblocco o a bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)
 - Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
 - Rack a separazione magnetica (compatibile con provette da 1,5 ml)
 - Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti
 - Pipette multicanale (P10 o P20; P100; P200)
 - Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)
 - Termociclatore (coperchio riscaldato programmabile)
 - Miscelatore a vortice



4.2. Preparazione libreria

4.2.1. Preparazione del DNA genomico

MATERIALI

- DNA genomico a doppio filamento di alta qualità (gDNA)
- FX Enhancer
- IDTE
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

IMPORTANTE

L'integrità, la concentrazione e la purezza del DNA sono fondamentali in questo passaggio. La purezza del DNA può essere valutata con uno spettrofotometro UV. I rapporti di assorbanza raccomandati sono entro 1,8-2,0 per il rapporto 260/280, ed entro 1,6-2,4 per 260/230. Si raccomanda di verificare l'integrità del campione mediante elettroforesi capillare o una tecnica equivalente. Per evitare errori nell'input del DNA, si raccomanda una diluizione iniziale per ottenere una concentrazione compresa tra 50 e 100 ng/μl. La concentrazione del DNA dovrebbe essere confermata tramite quantificazione fluorometrica (ad es. Qubit®, Thermo Fisher) e il valore ottenuto dovrebbe essere usato per calcolare la diluizione finale.

PREPARAZIONE

Rimuovere la soluzione di condizionamento FX Enhancer dalla conservazione a -20 °C e scongelare a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mescolare il reagente invertendo delicatamente la provetta 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

A seconda del formato del kit, il numero di campioni di DNA da raggruppare per ciascuna reazione di cattura varia secondo la seguente tabella. Questo aspetto deve essere preso in considerazione prima di iniziare.

FORMATO DEL KIT	Kit da 16 campioni	Kit da 32 campioni	Kit da 48 campioni	Kit da 96 campioni*
Numero di librerie individuali per cattura	4	8	12	12

* Per 96 campioni vengono forniti due kit da 48 campioni, che includono 8 reazioni di cattura.

PROCEDURA

1. Preparare le seguenti strisce PCR in base al numero di reazioni:

NUMERO DI REAZIONI	4	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR	4 provette	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Numero di strisce	1	2	3	2	3	4	6



2. Preparare una diluizione per ciascun campione di DNA genomico (gDNA) di alta qualità nel numero appropriato di strisce PCR come segue:

DILUIZIONE gDNA	
gDNA	200 ng
IDTE	Completare a 30 µl

- Mescolare brevemente pipettando delicatamente su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga per raccogliere tutto il liquido.



Suggerimento: punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C.

- A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, aggiungere 5 µl di FX Enhancer a ciascuna provetta della striscia da 4 provette contenente 30 µl di campioni di gDNA (un totale di 35 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 provette).
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, procedere come segue:
 - Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di FX Enhancer aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
FX Enhancer (in µl)	11,5	17,5	11,5	17,5	24	36

- Usando una pipetta multicanale, aggiungere 5 µl di FX Enhancer dalle provette di cui sopra ai 30 µl di campioni di gDNA (totale di 35 µl in ciascuna provetta delle strisce da 4 o 8 provette).
- Usando una pipetta multicanale impostata su 20 µl, mescolare delicatamente pipettando su e giù 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

3. Tenere sul ghiaccio fino alla predisposizione della reazione di frammentazione enzimatica.

4.2.2. Preparazione dei pre-mix e dei reagenti

COMPONENTI E REAGENTI

- FX Enzyme Mix (FX Mix enzimi)
- FX Buffer (FX tampone) 10x
- DNA Ligase Buffer (tampone DNA ligasi) 5x
- DNA Ligase (DNA ligasi)
- HiFi PCR Master Mix 2x
- Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® amplificatore librerie)
- Acqua senza nucleasi
- Sfere AMPure® XP
- Etanolo



PREPARAZIONE

- Rimuovere i componenti di SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I dalla conservazione a -20°C e scongelare sul ghiaccio.
- Rimuovere la piastra adattatrice a doppio indice dal luogo di conservazione a -20 °C e metterla in frigorifero a 4 °C per usarla successivamente.
- Rimuovere le sfere AMPure® XP dal luogo di conservazione a 2-8 °C e lasciarle acclimatare alla temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
- Preparare l'etanolo fresco all'80% (volume secondo il seguente schema in base al numero di reazioni):

80% ETANOLO							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
80% Etanolo (in ml)	10	20	30	30	40	50	70

- Una volta scongelati i componenti del SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I, mescolare i reagenti capovolgendo la provetta 5-10 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

PRE-MIX

1. Preparare il **pre-mix di reazione FX** come segue:

PRE-MIX DI REAZIONE FX							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
FX Buffer (FX tampone) 10x (in µl)	23,6	47,1	75	95	150	190	300
FX Enzyme Mix (FX Mix enzimi) (in µl)	47,1	94,2	150	190	300	380	600

- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
- Tenere sul ghiaccio.

2. Preparare il **pre-mix di legatura** come segue:

PRE-MIX DI LEGATURA							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
DNA Ligation Buffer 5x (in µl)	95	190	300	380	600	760	1200
DNA Ligase (DNA ligasi) (in µl)	47,5	95	150	190	300	380	600
Acqua senza nucleasi (in µl)	71,3	142,5	225	285	450	570	900

- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.



- Tenere sul ghiaccio.



Importante: il tampone di legatura del DNA è altamente viscoso; pipettare delicatamente e assicurarsi di ottenere un pre-mix di legatura omogeneo.

3. Preparare il **pre-mix PCR** come segue:

PRE-MIX PCR							
Numero di reazioni	4	8	12	16	24	32	48
HiFi PCR Master Mix 2x (in µl)	115	230	345	460	690	920	1380
Primer Mix Illumina® Library Amp (Primer Mix Illumina® amplificatore librerie) (in µl)	6,9	13,8	20,7	27,6	41,4	55,2	82,8
Acqua senza nucleasi (in µl)	16,1	32,2	48,3	64,4	96,6	128,2	193,2

- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
- Tenere sul ghiaccio.

4.2.3. Frammentazione enzimatica, riparazione finale e A-tailing

MATERIALI

- gDNA a doppio filamento diluito e condizionato in 35 µl
- Pre-mix di reazione FX
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

- Programmare il termociclatore per FX Fragmentation con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN MINUTI)
Coperchio	70	-
Passaggio 1	4	1
Passaggio 2	32	5
Passaggio 3	65	30
Mantenere	4	∞

- Avviare il programma FX Fragmentation. Quando il blocco raggiunge il passaggio 1 (4 °C), mettere in pausa il programma.



PROCEDURA



Importante: tenere sempre i campioni e il pre-mix sul ghiaccio prima e dopo l'incubazione per bloccare la reazione enzimatica.

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:

- Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
- Se si stanno processando **8 o più campioni**, per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix di reazione FX aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix di reazione FX (in μ l)	33	52,5	33	52,5	66	105

2. Assemblare la reazione come segue:

- Utilizzando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 15 μ l di pre-mix di reazione FX a ciascuno dei 35 μ l di campioni di gDNA (totale di 50 μ l in strisce da 4 o 8 provette).
- Usando una pipetta impostata a 40 μ l (multicanale se si stanno processando 8 o più campioni), mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte e centrifugare brevemente in una microcentrifuga.

3. Mettere nel termociclatore e continuare il programma FX Fragmentation.

Procedere immediatamente alla legatura

4.2.4. Legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione della frammentazione FX in 50 μ l ciascuno
- Pre-mix di legatura
- Adattatori a doppio indice
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PREPARAZIONE

- Rimuovere la piastra adattatrice a doppio indice da 4 °C (trasferita da -20 °C a 4 °C in precedenza) e far centrifugare brevemente la piastra per raccogliere tutto il liquido. Fare riferimento all'Appendice 1 per il rispettivo formato della piastra.
- Durante la frammentazione FX, preparare nuove strisce PCR con 5 μ l di diversi adattatori a doppio indice per ciascuna provetta come da strategia di indicizzazione, secondo lo schema seguente:



NUMERO DI REAZIONI	4	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR	4 provette	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Numero di strisce	1	2	3	2	3	4	6

- Impostare il termociclatore a 20 °C (coperchio aperto)

PROCEDURA

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:
 - Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
 - Se si stanno processando **8 o più campioni**, per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di legatura in un nuovo set di strisce PCR secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix legatura (in µl)	100	160	100	160	200	320

2. Usando una pipetta multicanale, trasferire 50 µl del prodotto di reazione di ciascuna frammentazione FX alle strisce da 4 o 8 provette contenenti 5 µl di adattatori a doppio indice.
3. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
4. Usando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 45 µl di pre-mix di legatura al prodotto di reazione di ciascuna frammentazione FX (55 µl in ciascuna provetta della striscia da 4 o 8 provette).
5. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
6. Incubare nel termociclatore a 20 °C per 15 minuti (coperchio aperto).



Importante: al termine della legatura, non posizionare le strip sul ghiaccio, poiché così facendo si potrebbe ridurre l'efficienza di legame del DNA alle sfere.

Procedere alla pulizia post legatura.

4.2.5. Pulizia post-legatura

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati in 100 µl ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml



PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 80 µl di sfere AMPure® XP ogni 100 µl di prodotti di reazione di legatura. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 170 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere. Incubare da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.
8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 105 µl di acqua senza nucleasi alle sfere e attendere qualche secondo.

Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Utilizzando una pipetta multicanale, trasferire accuratamente 100 µl del surnatante in nuove strisce etichettate da 4 o 8 provette.

Procedere alla selezione dimensione doppia

4.2.6. Selezione dimensione doppia

MATERIALI

- Prodotti di reazione legati in 100 µl ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- IDTE
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml



PROCEDURA

1. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 60 μ l di sfere AMPure XP a ciascuno dei 100 μ l di prodotti di reazione legati. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Utilizzando una pipetta multicanale, trasferire accuratamente 140 μ l del surnatante in nuove strisce etichettate da 4 o 8 provette contenenti 20 μ l di sfere AMPure XP. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
5. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
6. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 3 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
7. Eliminare accuratamente 150 μ l del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

8. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 μ l di etanolo all'80% alle sfere.
Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
9. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
10. Ripetere i passaggi 8 e 9 una volta.
11. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
12. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 4 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

13. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 μ l di IDTE alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.

Procedere all'amplificazione della libreria.

4.2.7. Amplificazione della libreria

MATERIALI

- Prodotti di legatura selezionati a doppia dimensione e sfere risospese in 20 μ l di IDTE ciascuno.
- Pre-mix PCR

PREPARAZIONE

Programmare il termociclatore per l'amplificazione della libreria con le seguenti impostazioni:



	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	
Passaggio 1: denaturazione iniziale	98	120	
Passaggio 2: denaturazione	98	20	8 cicli
Passaggio 3: annealing	60	30	
Passaggio 4: estensione	72	30	
Passaggio 5: estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	

PROCEDURA

1. A seconda del numero di campioni, procedere come segue:

- Se si stanno processando **4 campioni**, procedere al passaggio 2.
- Se si stanno processando **8 o più campioni**, procedere come segue:
 - a. Per facilitare il pipettaggio, creare una riserva di pre-mix PCR aggiungendo i seguenti volumi a un nuovo set di strisce da 4 o 8 provette secondo il seguente schema:

NUMERO DI REAZIONI	8	12	16	24	32	48
Striscia PCR (1 striscia)	4 provette	4 provette	8 provette	8 provette	8 provette	8 provette
Pre-mix PCR (in µl)	65	100	65	100	130	200

2. Assemblare la reazione come segue:

- Utilizzando una pipetta multicanale, se si stanno processando 8 o più campioni, aggiungere 30 µl di pre-mix PCR ai prodotti di legatura selezionata a doppia dimensione e alle sfere (volume totale 50 µl = 30 µl + 20 µl).
- Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.

3. Mettere le provette nel termociclatore ed eseguire il programma Amplificazione della libreria.



Suggerimento: punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C.



4.2.8. Pulizia post-amplificazione

MATERIALI

- Prodotti di reazione PCR in 50 µl ciascuno
- Sfere AMPure XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- Acqua senza nucleasi
- Provette a basso legame con il DNA per la conservazione delle librerie

PROCEDURA

1. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 50 µl di sfere AMPure XP ogni 50 µl di prodotto PCR. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 90 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere.
Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo usando una pipetta multicanale.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.
8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta multicanale P10 o P20.
9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 20 µl di acqua senza nucleasi alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare per raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le strisce da 4 o 8 provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Trasferire con attenzione 18 µl di surnatante (si consiglia di trasferire due volte 9 µl in questo passaggio) in una nuova provetta etichettata per la conservazione della libreria.



Suggerimento: punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C o -20 °C per una conservazione più lunga.



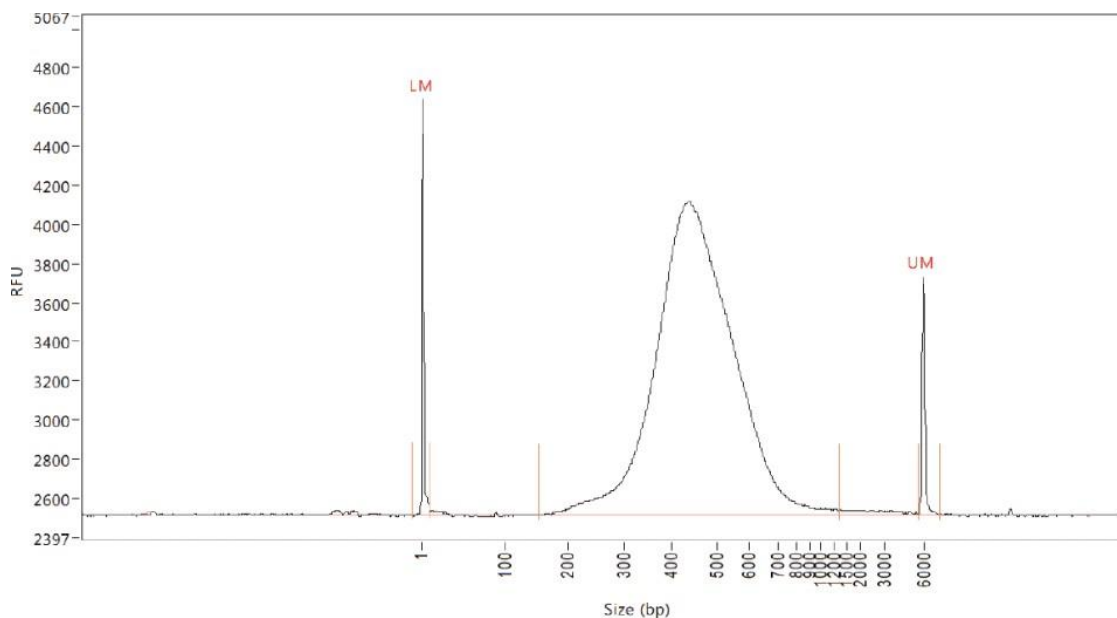
4.2.9. Quantificazione individuale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

- Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
- Sistema di elettroforesi capillare
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

1. Preparare una diluizione quadrupla di ciascuna libreria con acqua senza nucleasi (ad es., 2 μ l di biblioteca in 6 μ l di acqua senza nucleasi).
2. Quantificare le librerie con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 μ l della diluizione quadrupla della libreria precedente).
3. Controllare la qualità delle librerie analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 300 bp e 700 bp.



Esempio di distribuzione della libreria di DNA ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer. Marker superiore (UM), marker inferiore (LM)



4.3. Cattura

4.3.1. Pooling della libreria

MATERIALI

- Librerie individuali
- Human Cot DNA
- Universal Blockers - TS Mix
- Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml

PROCEDURA

1. Preparare un pre-mix di quanto segue in una provetta a basso legame con il DNA:

NUMERO DI CATTURE (Fare riferimento alla tabella del punto 3)	1	2	3	4
Human Cot DNA (in µl)	5	11	16,5	22
Universal Blockers - TS Mix (in µl)	2	4,4	6,6	8,8

2. Se si stanno eseguendo due o più catture, pipettare 7 µl del pre-mix precedente in singole provette a basso legame con il DNA.
3. Alle singole provette contenenti il pre-mix precedente, aggiungere un pool di librerie individuali secondo il formato del kit:

FORMATO DEL KIT	Kit da 16 campioni	Kit da 32 campioni	Kit da 48 campioni	Kit da 96 campioni
Numero di librerie individuali per cattura	4	8	12	12
Quantità di ciascuna libreria per cattura	300 ng	200 ng	150 ng	150 ng
Quantità totale di librerie per cattura	1200 ng	1600 ng	1800 ng	1800 ng

4. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
5. Asciugare ciascun mix utilizzando un concentratore di DNA sotto vuoto fino a quando il mix sarà completamente liofilizzato. Utilizzare un riscaldamento leggero (45-50 °C) per accelerare la liofilizzazione.



Suggerimento: punto di arresto sicuro durante la notte a -20 °C.



4.3.2. Ibridazione

MATERIALI

- Librerie liofilizzate
- 2x tampone di ibridazione
- Potenziatore per tamponi di ibridazione
- Myeloid Solution probes
- Acqua senza nucleasi
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml
- Provette da 1,5 ml
- 10x tampone di lavaggio I
- 10x tampone di lavaggio II
- 10x tampone di lavaggio III
- 10x tampone di lavaggio stringente
- 2x tampone di lavaggio sfere

PREPARAZIONE

1. Preriscaldare il termociclatore a 95 °C (impostare il coperchio a 99 °C).
2. Dopo i 10 minuti di denaturazione, passare direttamente a 65 °C (impostare il coperchio a 75 °C).



Importante: si raccomanda l'uso di diversi termociclatori per incubazioni a 95 °C e 65 °C, se disponibili.

PROCEDURA

1. Preparare un pre-mix di ibridazione in base al numero di reazioni di cattura:

NUMERO DI CATTURE	1	2	3	4
2x tampone di ibridazione (in µl)	8,5	18,7	28,05	37,4
Potenziatore per tamponi di ibridazione (in µl)	3,4	7,48	11,22	14,96
Acqua senza nucleasi (in µl)	1,1	2,42	3,63	4,84

2. Risospendere il pellet liofilizzato in 13 µl di pre-mix di ibridazione.
3. Trasferire il pellet risospeso in una provetta PCR (una provetta per ciascuna reazione di cattura).
4. Incubare nel termociclatore a 95 °C per 10 minuti.



Importante: non lasciare che la temperatura della provetta scenda sotto i 65 °C dal passaggio 3 al passaggio 5: questo può portare a un annealing errato della sonda.

5. Spostare la provetta PCR dal termociclatore da 95 °C a 65 °C, quindi aggiungere 4 µl di sonde al mix. Usando una pipetta impostata a 13 µl, mescolare accuratamente pipettando su e giù per 5 volte.
6. Incubare nel termociclatore a 65 °C per 4 ore.
7. Preparare in anticipo 1x soluzioni di lavoro dei diversi tamponi di lavaggio come descritto nelle pagine seguenti per permettere loro di raggiungere l'equilibrio durante la reazione di ibridazione.



PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 1 REAZIONE

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	33	297	330
10x tampone di lavaggio II	22	198	220
10x tampone di lavaggio III	22	198	220
10x tampone di lavaggio stringente	44	396	440
2x tampone di lavaggio sfere	275	275	550



Importante: preriscaldare 1x tampone stringente e aliquotare 110 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65°C in un termoblocco o in un bagno d'acqua per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 2 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	66	594	660
10x tampone di lavaggio II	44	396	440
10x tampone di lavaggio III	44	396	440
10x tampone di lavaggio stringente	88	792	880
2x tampone di lavaggio sfere	550	550	1100



Importante: preriscaldare 1x tampone stringente e aliquotare 220 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 3 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	99	891	990
10x tampone di lavaggio II	66	594	660
10x tampone di lavaggio III	66	594	660
10x tampone di lavaggio stringente	132	1188	1320
2x tampone di lavaggio sfere	825	825	1650



Importante: preriscaldare 1x tampone stringente e aliquotare 330 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.



PREPARAZIONE DEL TAMPONE DI LAVAGGIO PER 4 REAZIONI

TAMPONE	TAMPONE STOCK (μl)	ACQUA (μl)	VOLUME FINALE 1X (μl)
10x tampone di lavaggio I	132	1188	1320
10x tampone di lavaggio II	88	792	880
10x tampone di lavaggio III	88	792	880
10x tampone di lavaggio stringente	176	1584	1760
2x tampone di lavaggio sfere	1100	1100	2200



Importante: preriscaldare 1x tampone stringente e aliquotare 440 μl di 1x tampone di lavaggio I a 65 °C in un termoblocco o a bagnomaria per almeno 2 ore. Tenere il restante tampone di lavaggio I a temperatura ambiente.

4.3.3. Preparazione delle sfere di streptavidina

MATERIALI

- Sfere di streptavidina equilibrate a temperatura ambiente
- 1x tampone di lavaggio sfere
- Provette da 1,5 ml
- Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml

PROCEDURA

Eeguire questi passaggi poco prima della fine dell'incubazione di ibridazione di 4 ore.

1. Miscelare le sfere a vortice per 15 secondi.
2. Trasferire 100 μl di sfere per cattura (200 μl per 2 reazioni, 300 μl per 3 reazioni, 400 μl per 4 reazioni) in una singola provetta da 1,5 ml.
3. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
4. Aggiungere 200 μl di 1x tampone di lavaggio sfere per cattura (400 μl per 2 reazioni, 600 μl per 3 reazioni, 800 μl per 4 reazioni) alla provetta. Agitare per 10 secondi.
5. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
6. Ripetere i passaggi 4 e 5 una volta.
7. Aggiungere 100 μl di 1x tampone di lavaggio sfere per cattura (200 μl per 2 reazioni, 300 μl per 3 reazioni, 400 μl per 4 reazioni) alla provetta. Agitare per 10 secondi.
8. Trasferire 100 μl di sfere pulite in una nuova provetta PCR (una provetta per ciascuna reazione di cattura).



9. Posizionare le provette su un rack magnetico formato piastra a 96 pozzetti e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.



Importante: non lasciar asciugare le sfere.

Procedere immediatamente al legame dei target ibridati alle sfere.

4.3.4. Legame di target ibridati alle sfere

MATERIALI

- Sfere di streptavidina pulite in provette PCR
- Reazione(i) di ibridazione

PROCEDURA



Importante: lavorare rapidamente per assicurarsi che la temperatura del campione rimanga vicino a 65 °C.

1. Rimuovere le reazioni di ibridazione dal termociclatore e centrifugare brevemente le provette e rimetterle sul termociclatore.
2. Posizionare le provette con le sfere di streptavidina lavate nel termociclatore (non più di due provette alla volta per evitare l'essiccazione delle sfere).
3. Per ciascuna reazione di ibridazione, trasferire 17 µl della soluzione di reazione di ibridazione in una provetta PCR contenente sfere pulite. Risospendere le sfere pipettando su e giù fino a quando la soluzione è omogenea.
4. Legare il DNA alle sfere mettendo le provette in un termociclatore a 65 °C (coperchio a 75 °C). Incubare per 45 minuti.
5. Durante l'incubazione, pipettare delicatamente su e giù le provette ogni 15 minuti per assicurarsi che le sfere rimangano in sospensione.

Procedere direttamente al lavaggio delle sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato.

4.3.5. Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato

MATERIALI

- | | |
|---|---|
| • Target ibridati su sfere | • 1x tampone di lavaggio II |
| • Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi da 0,2 ml | • 1x tampone di lavaggio III |
| • Provette a basso legame con il DNA da 1,5 ml | • 1x tampone di lavaggio stringente (a 65 °C) |
| • 1x tampone di lavaggio I (1/3 a 65 °C e 2/3 a temperatura ambiente) | • Acqua senza nucleasi |
| | • IDTE |



PROCEDURA



Importante: lavorare in modo di assicurarsi che la temperatura rimanga vicina ai 65 °C per i passaggi da 1 a 7.

Nota: Se si lavora con 2 o più provette di cattura, lavorare in modo sfalsato dal passaggio 2 al passaggio 8, includendo quanto segue:

1. Quando si mette la prima provetta nel termoblocco a 65 °C per la prima incubazione di 5 minuti (passaggio 5), avviare un timer.
2. Iniziare a processare la seconda provetta.
3. Quando si posiziona la seconda provetta a 65 °C, notare il tempo che separa le provette e assicurarsi di rispettare questo intervallo durante i passaggi da 2 a 8 per garantire che ciascuna provetta incubi esattamente per 5 minuti a 65 °C con il lavaggio stringente.

1. Aggiungere 100 µl di 1x tampone di lavaggio I (a 65 °C) a ciascuna delle provette con target ibridato/sfere di streptavidina.
2. Lavorando con una provetta alla volta, risospendere e trasferire la miscela una alla volta in una nuova provetta a basso legame con il DNA da 1,5 ml. Se si lavora con due o più provette di cattura, lavorare in modo sfalsato come indicato sopra.
3. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
4. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio stringente (a 65 °C) alla provetta.
Risospendere delicatamente le sfere pipettando su e giù.

La forte miscelazione delle sfere con il tampone di lavaggio stringente potrebbe diminuire la qualità della cattura.

5. Incubare a 65 °C per 5 minuti.
6. Posizionare la provetta su un rack magnetico e lasciarla riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
7. Ripetere i passaggi da 4 a 6 una volta.

Lavorare a temperatura ambiente.

8. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio I (a temperatura ambiente) alla provetta. Risospendere delicatamente le sfere pipettando su e giù.

Nota: se si lavora con 2 o più provette di cattura, da questo passaggio in avanti, processare tutte le provette contemporaneamente.

9. Agitare per 2 minuti.
10. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
11. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio II a ciascuna provetta. Agitare per 1 minuto.
12. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.



13. Aggiungere 200 µl di 1x tampone di lavaggio III a ciascuna provetta. Agitare per 30 secondi. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
14. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
15. Aggiungere 200 µl di 1x IDTE a ciascuna provetta. Risospendere le sfere. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
16. Posizionare le provette su un rack magnetico e lasciar riposare fino a quando la soluzione diventa chiara. Rimuovere con cura ed eliminare il surnatante.
17. Rimuovere tutto il liquido rimanente utilizzando una pipetta P10 o P20.
18. Aggiungere 20 µl di acqua senza nucleasi a ciascuna provetta, risospendere e trasferire la miscela di sfere/acqua in una nuova provetta PCR.

4.3.6. Amplificazione post-cattura

MATERIALI

- Sospensione di sfere di streptavidina/acqua senza nucleasi (20 µl)
- 2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix
- 10x Primer Mix per amplificazione librerie
- Acqua senza nucleasi

PREPARAZIONE

Programmare il termociclatore per l'amplificazione post-cattura con le seguenti impostazioni:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (IN SECONDI)	
Coperchio	99	-	15 cicli
Passaggio 1: denaturazione iniziale	98	45	
Passaggio 2: denaturazione	98	15	
Passaggio 3: annealing	60	30	
Passaggio 4: estensione	72	30	
Passaggio 5: estensione finale	72	60	
Mantenere	10	∞	



PROCEDURA

1. Preparare il pre-mix PCR come segue:

PRE-MIX PCR				
Numero di reazioni	1	2	3	4
2x KAPA™ HiFi HotStart ReadyMix (in µl)	25	55	82,5	110
10x Primer Mix per amplificazione librerie (in µl)	2,5	5,5	8,25	11
Acqua senza nucleasi (in µl)	2,5	5,5	8,25	11

2. Aggiungere 30 µl di pre-mix PCR a ciascuna sospensione di sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte e centrifugare brevemente.
3. Posizionare le provette nel termociclatore ed eseguire il programma di amplificazione post-cattura.



Suggerimento: punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C o -20 °C per una conservazione più lunga.

4.3.7. Pulizia post-cattura dell'amplificazione

MATERIALI

- Prodotti di reazione PCR in 50 µl ciascuno
- Sfere AMPure® XP equilibrate a temperatura ambiente
- Etanolo appena preparato all'80%
- IDTE
- Provette a basso legame con il DNA per la conservazione delle librerie

PROCEDURA

1. Aggiungere 50 µl di sfere AMPure® XP a ciascuno dei 50 µl di prodotti di reazione PCR. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte.
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
3. Posizionare le provette su un rack magnetico per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
4. Eliminare accuratamente 90 µl del surnatante usando una pipetta multicanale.

Tenere le provette sul rack magnetico per i passaggi successivi.

5. Usando una pipetta multicanale, aggiungere 170 µl di etanolo all'80% alle sfere. Lasciar riposare le provette da 30 secondi a 1 minuto.
6. Eliminare accuratamente l'etanolo.
7. Ripetere i passaggi 5 e 6 una volta.



8. Rimuovere l'etanolo residuo usando una pipetta P10 o P20.
9. Asciugare all'aria le sfere a temperatura ambiente per 5 minuti. Non asciugare troppo le sfere perché questo potrebbe diminuire la quantità di DNA recuperato.

Rimuovere le provette dal rack magnetico.

10. Aggiungere 20 μ l di IDTE alle sfere. Mescolare accuratamente pipettando su e giù per 10 volte. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere tutto il liquido.
11. Posizionare le provette su un rack magnetico per 5 minuti o fino a quando il liquido diventa chiaro.
12. Trasferire con attenzione 18 μ l di surnatante (si consiglia di trasferire due volte 9 μ l in questo passaggio) in una nuova provetta etichettata per la conservazione della libreria.



Suggerimento: punto di arresto sicuro durante la notte a 4 °C o -20 °C per una conservazione più lunga.

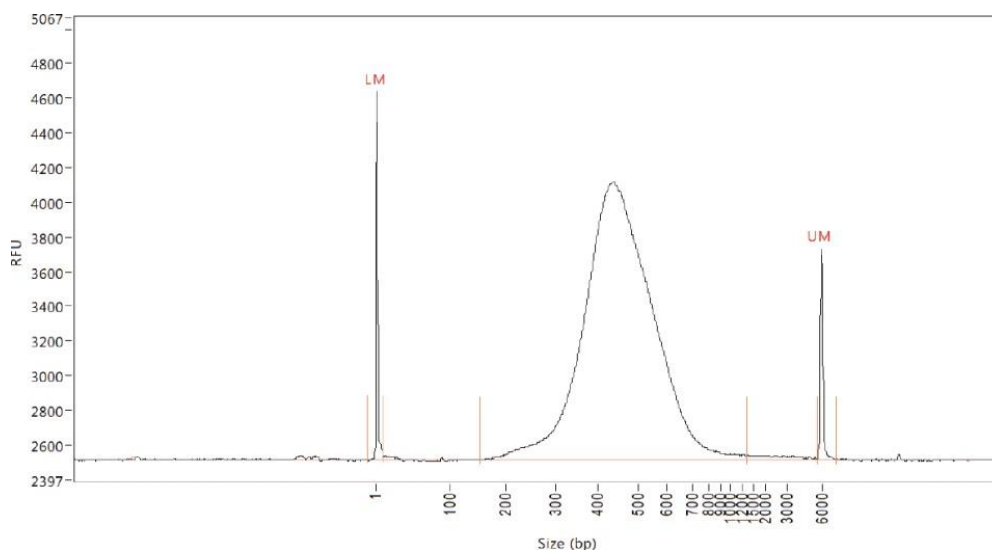
4.3.8. Quantificazione finale della libreria e controllo qualità

MATERIALI

- Attrezzatura e reagenti per la quantificazione fluorometrica
- Sistema di elettroforesi capillare

PROCEDURA

1. Quantificare tutti i pool della libreria catturati con un metodo fluorometrico (ad es. quantificazione con Qubit HS utilizzando 2 μ l della libreria).
2. Controllare la qualità del pool di librerie catturato analizzandone il profilo tramite elettroforesi capillare. I frammenti di DNA della libreria dovrebbero avere una distribuzione delle dimensioni fra 300 bp e 700 bp.



Esempio di distribuzione delle dimensioni del pool della libreria catturato ottenuta con sistema di elettroforesi capillare Agilent Fragment Analyzer. Marker superiore (UM), marker inferiore (LM)



4.4. Sequenziamento

4.4.1. Preparazione della libreria per il sequenziamento

MATERIALI

- Kit di reagenti Illumina MiSeq® Reagent Kit v3
- Librerie finali catturate
- Tampone EBT o simile

PROCEDURA

1. Determinare la molarità di ciascun pool con la dimensione media della libreria (dimensione del picco in coppie di basi) e la concentrazione (ng/μl) ottenuta durante il passaggio 5.3.8 come segue:

$$\text{Molarità della libreria (nM)} = \frac{\text{Concentrazione della libreria (ng/μl)}}{\text{Dimensione media in coppie di basi} \times 649,5} \times 10^6$$

2. Diluire ciascun pool a 4 nM e mescolarli in quantità uguali (ad es. 5 μl di ciascuno). Mescolare bene e usare questa diluizione secondo le raccomandazioni sulla denaturazione dello standard Illumina®.
3. Caricare una diluizione di 10 pM delle librerie denaturate su MiSeq®.
4. Le letture minime raccomandate sono 2,0 milioni di letture per campione, con una lunghezza di lettura di 300 bp.

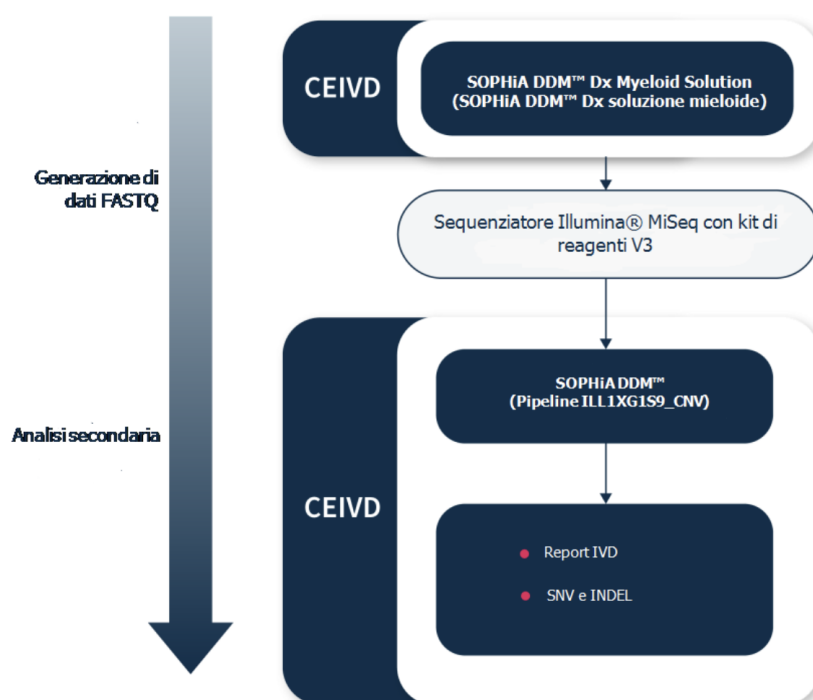


5. PROCEDURA DI ANALISI

5.1. Istruzioni per l'installazione della modalità SOPHiA DDM™ Dx

Per utilizzare la modalità SOPHiA DDM™ Dx non è necessaria alcuna installazione. Verrà inviata un'e-mail con le istruzioni e un link alla modalità SOPHiA DDM™ Dx. Per informazioni sulla gestione dell'account, sui browser compatibili e per altri avvisi importanti, consultare il manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx. I documenti di supporto sono disponibili anche direttamente nella modalità SOPHiA DDM™ Dx.

5.2. Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la generazione di risultati IVD



Descrizione del flusso di lavoro di analisi per la SOPHiA DDM™ Dx Myeloid Solution

Per la descrizione completa del flusso di lavoro di caricamento, fare riferimento al manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx.



6. LIMITAZIONI, AVVERTENZE E PRECAUZIONI

AVVERTENZE GENERALI

- Per le istruzioni dettagliate sul software, consultare il manuale utente della modalità SOPHiA DDM™ Dx.
- Se si modifica qualunque parte della manipolazione, del protocollo, del sequenziatore, del multiplexing ecc., le analisi non trovano corrispondenza nelle istruzioni per l'uso fornite.
- I dati forniti nel report sulla qualità (scaricabile dalla piattaforma SOPHiA DDM™) sono solo a titolo informativo e non sono destinati a essere utilizzati per le diagnosi.
- L'accuratezza dei risultati dell'analisi non può essere garantita. I laboratori di sequenziamento devono effettuare controlli di qualità dei campioni e segnalare i campioni non qualificati. Campioni non qualificati (ad es. un campione biottico insufficiente) possono compromettere i risultati. SOPHiA GENETICS non è responsabile dei risultati e delle decisioni prese sulla base di questi risultati.
- Per ottenere le prestazioni che ci si aspetta dal prodotto, occorre attenersi a standard e procedure di buona pratica di laboratorio e seguire rigorosamente le IFU. Per informazioni specifiche sulla sicurezza, consultare le schede di sicurezza dei materiali (MSDS) corrispondenti fornite con ciascun componente del prodotto.
- Per evitare la contaminazione del campione di DNA, devono essere predisposti locali fisicamente separati per il pre e il post PCR. Utilizzare sempre reagenti nuovi e DNA estratto e conservato correttamente. Per i dettagli su qualità e integrità del DNA, si rimanda alla sezione 5 delle IFU. Materiali e metodi del kit - Sezione 5.2.1 Preparazione del DNA genomico.
- Per eseguire l'esperimento, usare pipette calibrate correttamente e attrezzature di laboratorio adeguate.
- Non mischiare reagenti con numeri di lotto diversi
- Le decisioni sulla cura e il trattamento del paziente devono essere basate sul criterio indipendente del medico curante, prendendo in considerazione tutte le informazioni applicabili riguardanti la condizione del paziente, tra cui la storia clinica del paziente e della famiglia, esami fisici, le informazioni fornite da altri test diagnostici e le preferenze del paziente, in conformità con gli standard sanitari della comunità.

LIMITAZIONI GENERALI

- La scarsa qualità dei dati dovuta a problemi nella preparazione del campione o nel passaggio di sequenziamento può confondere l'analisi dei dati e generare falsi positivi e/o falsi negativi.
- L'assenza di una variante nel report non esclude la presenza di una variazione con valori al di sotto dei limiti di rilevamento del test.



PER PROCEDURE DIAGNOSTICHE IN VITRO

SNV / INDEL

- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato per il rilevamento degli SNV e degli INDEL corti (fino a 2/3 della lunghezza della lettura). Si noti che qualsiasi altro tipo di alterazione può essere mancato dall'algoritmo.
 1. Le fusioni o inversioni geniche non possono essere rilevate.
 2. Delezioni o inserzioni con un breakpoint al di fuori della regione target potrebbero non essere rilevate.
- Il rilevamento delle varianti in questo prodotto è stato ottimizzato sulle regioni definite come "regioni target". Si noti che le regioni al di fuori di questa definizione potrebbero generare falsi negativi e/o falsi positivi.
- Per una buona prestazione dell'algoritmo, si raccomanda una copertura di almeno 1.000x per soddisfare la significatività statistica rispetto al rumore per la maggior parte delle posizioni. Una copertura inferiore aumenterà significativamente il rischio di chiamate di varianti false negative.
- Le varianti possono essere mancate o chiamate erroneamente a causa di limitazioni nel design del kit.
- Le varianti nelle regioni per le quali il relativo frammento di DNA non viene estratto dalle sonde non possono essere rilevate dal prodotto. La cattura delle varianti può essere limitata da:
 1. INDEL che influenzano l'ibridazione delle sonde. Questo può portare all'assenza di rilevamento o a una stima errata della frazione della variante.
 2. La presenza di una o più mutazioni aggiuntive nella regione target della sonda sullo stesso allele.
- SNV o INDEL in omopolimeri con una lunghezza di dieci coppie di base o superiore non possono essere chiamati in modo attendibile dal momento che il loro rilevamento è confuso da un elevato rumore di fondo.
- Potrebbero essere segnalate varianti deletion-insertion (delins) complesse come varianti multiple nel caso in cui vengano rappresentate nell'allineamento come più varianti più piccole separate da più di 2 nucleotidi.
- Anche gli SNV o gli INDEL nelle regioni a lunga ripetizione o a bassa complessità specificate nelle regioni contrassegnate nell'Appendice 4 potrebbero essere mancati.
- Le regioni contrassegnate nell'Appendice 4 presentano caratteristiche che rendono inattendibile il rilevamento delle varianti. Vengono segnalate con avvertenze nell'interfaccia SOPHiA DDM™, e le varianti rilevate in queste regioni vengono contrassegnate con un flag.
- Le regioni con un'alta omologia di sequenza possono causare incertezza nella mappatura e il rischio di perdere o chiamare varianti errate.
- Le varianti potrebbero essere rappresentate in forme diverse in una data regione. Se una parte delle letture riporta la variante in una forma diversa o non cattura la variante, la frazione di variante può essere sottostimata, o la variante può essere mancata a causa della bassa frazione.
- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere riportate correttamente. In particolare, quando un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi in modo univoco l'inserzione più piccola, e quest'ultima potrebbe essere mancata e potrebbe essere riportata solo l'inserzione più grande.



- Nel caso di inserzioni/duplicazioni multiple presenti all'interno della stessa regione, non tutte potrebbero essere quantificate correttamente. In particolare, se un'inserzione più piccola è completamente contenuta all'interno di un'inserzione più grande, potrebbe non esserci alcuna lettura che identifichi univocamente l'inserzione più piccola e la frazione di variante riportata per l'inserzione più piccola potrebbe essere sottostimata e la frazione di variante dell'inserzione più grande sovrastimata.
- Il cross-talk del campione dovuto all'index-hopping può essere aggravato dai seguenti fattori:
 1. Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello
 2. Sovraccarico della cella di flusso, ovvero alta densità del cluster
 3. Differenze nel tasso di conversione della libreria
- Il cross-talk del campione in presenza di una contaminazione dell'indice di basso livello (<1%) può essere aggravato dai seguenti fattori:
 1. Copertura molto alta in uno o pochi campioni a causa di problemi durante la quantificazione / normalizzazione del campione o amplificazioni geniche di alto livello
 2. Sovraccarico della cella di flusso, ovvero alta densità del cluster
 3. Differenze nel tasso di conversione della libreria
- Si raccomanda all'utente di interpretare con cautela le varianti segnalate al di sotto del 2,5% e possibilmente di usare metodi di test alternativi per confermare.
- Qualsiasi problema durante la processazione di NGS o problemi di degradazione del campione può causare un basso rapporto segnale-rumore e influenzare negativamente la chiamata delle varianti.
- Le alterazioni segnalate possono includere alterazioni somatiche (non ereditate) o germinali (ereditate); tuttavia, il test non distingue tra alterazioni germinali e somatiche. Il test non fornisce informazioni sulla suscettibilità.



7. VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE NON CLINICHE

7.1. METODI

Informazioni generali

In questo studio, sono state valutate le prestazioni del kit SOPHiA DDM™ Dx MYS e della pipeline SOPHiA DDM™ Dx ILL1XG1S9_CNV con dati generati su uno strumento Illumina MiSeq® utilizzando il test SOPHiA DDM™ Dx MYS. Il filtraggio delle varianti è stato impostato in base al rumore di fondo misurato nei campioni di diluizione germinale, e le presenti affermazioni riguardano le varianti al di sopra del limite di rilevamento determinato dai nostri esperimenti.

Gli omopolimeri di 10 bp o più sono stati esclusi, così come le regioni coperte da meno di 1000 letture. Per ciascun campione sono state confrontate le varianti rilevate dalla pipeline con le varianti confermate "gold standard" fornite da ciascuno dei centri di sequenziamento. Le varianti rilevate al di fuori delle regioni target non sono state considerate (vedere l'Appendice 4 per l'elenco completo delle regioni target e delle regioni contrassegnate). Una regione, l'esone 15 di JAK2 imbottito di 25 bp, presentava una copertura costantemente inferiore e quindi è stata esclusa dalle nostre analisi.

Definizioni di sensibilità, specificità, accuratezza, precisione, ripetibilità e riproducibilità

È stata presa in considerazione ciascuna posizione analizzata sia con il metodo di riferimento che con il metodo che combina l'uso dello strumento MiSeq® e del pannello SOPHiA DDM™ Dx MYS per calcolare parametri di performance analitica come la sensibilità, la specificità, l'accuratezza, la precisione e la coerenza.

Per tutte le posizioni coperte dal pannello SOPHiA DDM™ Dx MYS e per le quali erano disponibili informazioni di riferimento, sono stati determinati i numeri delle seguenti categorie: I veri positivi (True Positives (TP)) e i veri negativi (True Negatives (TN)) sono presenti in entrambi i set, i falsi positivi (False Positives (FP)) sono presenti solo nelle varianti rilevate da SOPHiA DDM™ Dx e i falsi negativi (False Negatives (FN)) sono presenti solo nella tabella delle varianti confermate. Tutte le posizioni schermate (TP+FP+TN+FN) sono state determinate sottraendo le posizioni indeterminate dalla regione target del pannello SOPHiA DDM™ Dx MYS, che è CDS ± 25 bp dei geni e degli esoni specificati nella documentazione SOPHiA DDM™ Dx MYS:

- Regioni non definite: regioni contenenti varianti a bassa attendibilità, o varianti confermate sotto la soglia di segnalazione, e per la riproducibilità e la ripetibilità, regioni sotto la profondità di 1000x (per valutare la riproducibilità e la ripetibilità della copertura)
- L'esone 15 di JAK2, che è stato identificato come una regione in cui la copertura è difficile
- Regioni note con artefatti (regioni contrassegnate)
- Regioni in cui non erano disponibili dati di riferimento o in cui i dati erano ambigui (vedere anche 5.1.3). Per esempio, il sequenziamento Sanger non può riportare grandi INDEL in FLT3, quindi queste varianti sono state escluse.

Inoltre, gli INDEL situati in regioni omopolimeriche di almeno 10 bp sono stati esclusi dai calcoli.



Tutti i parametri sono stati calcolati con le seguenti formule:

1. La **sensibilità** è stata determinata come percentuale delle varianti confermate rilevate:

$$\text{Sensibilità} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$$

2. La **specificità** è stata determinata come percentuale delle posizioni negative correttamente identificate come negative:

$$\text{Specificità} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$$

(con TN= tutte le posizioni schermo-TP-FP-FN)

3. L'**accuratezza** è stata determinata come percentuale delle chiamate corrette (positive e negative):

$$\text{Accuratezza} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \times 100$$

4. La **precisione** è stata determinata come percentuale delle chiamate positive corrette da tutte le chiamate positive:

$$\text{Precisione} = \frac{TP}{TP+FP} \times 100$$

5. La **ripetibilità del sequenziamento** è stata determinata, per ciascuna coppia di repliche intra-prova A e B, come percentuale delle basi ben definite (SP) in entrambi i campioni tra le basi ben definite in almeno un campione. Le basi sono considerate ben definite se sono sufficientemente coperte e non contengono chiamate di varianti a bassa attendibilità.

$$\text{Ripetibilità del sequenziamento} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}{\sum_{i \in [SP_A \cup SP_B]} 1}$$

6. **Ripetibilità della variante** - per calcolare la frazione di basi in entrambi i replicati vengono prese in considerazione tutte le posizioni ben definite in entrambi i replicati. Date le repliche intra-prova A e B con posizioni ben definite SPA e SPB, SPA[i] e SPB[i] rappresentano lo stato della variante nella posizione i. Essendo dx l'operatore che restituisce 1 quando x=0 e 0 quando x≠0, la ripetibilità della variante viene definita come:

$$\text{Ripetibilità della variante} = \frac{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} \delta_{SPA[i]-SPB[i]}}{\sum_{i \in [SP_A \cap SP_B]} 1}$$

7. La **ripetibilità** è stata definita come il prodotto delle due misure precedenti:

$$\text{Ripetibilità} = \text{Ripetibilità della variante} \times \text{Ripetibilità del sequenziamento} \times 100$$



8. **La riproducibilità** è stata definita in modo equivalente alla ripetibilità (vedere le formule (5)-(7)) per le repliche intra-prova A e B.

TP, FP, TN e FN sono stati calcolati sommando tutti i campioni di ciascuna prova. Sensibilità, specificità, accuratezza e precisione sono state calcolate sulla base di questi conteggi totali secondo le formule sopra indicate. Specificità, accuratezza e precisione sono state calcolate solo utilizzando campioni completamente caratterizzati a causa della mancanza di posizioni Vero negativo nei campioni parzialmente caratterizzati. La ripetibilità e la riproducibilità sono state calcolate utilizzando tutte le posizioni per tutti i campioni e tutte le prove considerate.

Per determinare gli intervalli di attendibilità in caso di sensibilità al 100% o altre misure, sono stati utilizzati i metodi descritti da Mattocks et al (2010) (Mattocks CJ et al, EuroGentest Validation Group, 2010). Nei casi in cui il criterio misurato è stato inferiore al 100%, è stato utilizzato il metodo esatto (Clopper, et al 1934) per ottenere l'intervallo di attendibilità sulla probabilità binomiale per la sensibilità, la specificità, l'accuratezza e la precisione (Clopper C et al, Biometrika, 1934). Per riflettere la vera diversità delle varianti, nei calcoli degli intervalli di attendibilità sono stati utilizzati solo i TP, FP, FN e TN unici.

7.2. DATI

I campioni disponibili sono stati raggruppati in due categorie a seconda della caratterizzazione ad alta attendibilità disponibile per tutti i confronti di riferimento. In primo luogo, i campioni parzialmente caratterizzati in cui sono state identificate varianti note ad alta attendibilità sono stati processati da SOPHiA GENETICS (sito A) o da partner esterni (siti da B a E) con le condizioni sperimentali raccomandate.

Questi risultati contengono una vasta casistica clinica rappresentativa e permettono di stimare la sensibilità per la denominazione delle varianti. Inoltre, sono stati inclusi i replicati per stimare la ripetibilità e la riproducibilità. La seconda categoria di campioni è costituita da campioni di riferimento con regioni ad alta attendibilità date dal fornitore o varianti ad alta attendibilità GIAB (Genome in a bottle), e campioni clinici in cui ampie porzioni delle regioni target SOPHiA DDM™ Dx MYS sono state analizzate mediante sequenziamento Sanger o altri metodi ad alta accuratezza (tenendo conto dei limiti di rilevamento dei rispettivi metodi). Questo insieme di campioni ben caratterizzati permette di determinare la specificità, la precisione e l'accuratezza, nonché la sensibilità. I dati di input provengono da diverse prove su più pazienti (un file di sequenza per ciascun paziente) eseguite da quattro centri di sequenziamento distinti: Sito A-E. Tutti i file di una prova sono stati analizzati congiuntamente come parte dello stesso processo di lotto.

7.3. CONCLUSIONI GENERALI

La seguente tabella riporta i riepiloghi completi delle varianti rilevate rispetto all'elenco delle varianti confermate (TP/FN) per ciascuna prova contenente campioni parzialmente caratterizzati.

Tabella 2. Riepiloghi delle varianti per ciascuna prova di campioni parzialmente caratterizzati

Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteA_Run01	1	15	0
SiteA_Run02	15	36	0
SiteA_Run03	16	37	0
SiteA_Run04	1	2	0
SiteA_Run06	1	15	0



Prova	N. di campioni	TP	FN
SiteA_Run07	21	31	0
SiteA_Run08	20	142	0
SiteA_Run09	20	142	0
SiteA_Run10	24	599	0
SiteA_Run11	10	15	0
SiteA_Run14	8	8	0
SiteA_Run15	14	14	0
SiteB_Run01	22	78	0
SiteB_Run02	18	55	1
SiteC_Run01	11	57	0
SiteC_Run02	10	40	0
SiteD_Run01	10	15	0
SiteE_Run01	15	31	0
Totale	237	1332	1

La seguente tabella riporta i riepiloghi completi delle varianti rilevate rispetto all'elenco delle varianti confermate (TP/FN/FP) e delle posizioni di base senza varianti (TN) per ciascuna prova di campioni completamente caratterizzati.

Tabella 3. Riepiloghi delle varianti per ciascuna prova di campioni completamente caratterizzati

Prova	N. di campioni	TP	FN	FP	TN
SiteA_Run08	18	132	0	0	469693
SiteA_Run09	18	132	0	0	469231
Altro	11	152	0	2	480194
Totale	47	416	0	2	1419118

La seguente tabella mostra le posizioni uniche della base TN e le varianti rilevate in questo studio di valutazione della performance. Il numero totale di posizioni di base nelle regioni analizzate è stato 48093 basi. Nello studio sono state rilevate 219 (duecentodiciannove) varianti uniche confermate. I veri negativi unici in cui sono stati disponibili dati di riferimento ad alta attendibilità hanno coperto un totale di 48092 bp, che a loro volta coprono il 99% delle regioni target meno l'esone JAK2 escluso (48547 bp).



Tabella 4. Riepiloghi delle varianti in tutte le prove

TP	219
FP	2
FN	1
TN	48092

7.4. RISULTATI

La combinazione dello strumento Illumina MiSeq® o HiSeq™, del test SOPHiA DDM™ Dx MYS e di SOPHiA DDM™ Dx porta a una performance osservata del 99,92% di sensibilità, 99,99% di specificità, 99,99% di accuratezza, 99,52% di precisione, 98,69% di ripetibilità e 99,30% di riproducibilità.

Tabella 5. Riepilogo della performance

N°	Misurazione della performance	Media	5° percentile
A	Tasso on-target	87,41%	[59,59%]
B	Uniformità	99,88%	[99,40%]
C	Limite di rilevamento	2,5%* (osservato)	[1%]

N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]**
1	Sensibilità	99,92%	[97,49%]
2	Specificità	99,99%	[99,98%]
3	Accuratezza	99,99%	[99,98%]
4	Precisione	99,52%	[91,47%]

N°	Misurazione della performance	Osservato	[IC meno del 95%]***
5	Ripetibilità	98,69%	[98,66%]
6	Riproducibilità	99,30%	[99,27%]

* Per SNV e INDEL; tranne FLT3 ITD.

** Gli IC al 95% sono stati calcolati sulle varianti uniche nello studio di valutazione delle prestazioni al fine di riflettere la reale diversità delle varianti.

*** Gli IC al 95% sono stati calcolati su tutte le posizioni per tutti i campioni. La ripetibilità e la riproducibilità si basano sui confronti descritti nell'equivalenza della selezione della doppia dimensione e della riproducibilità inter-sito.



8. SIMBOLI

Simbolo	Titolo
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Codice lotto (numero di lotto)
	Attenzione
	Produttore
	Limite di temperatura
	Data di scadenza
	Conformità europea
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Contiene un numero sufficiente per <n> test
	Importatore
	Data di produzione
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella “Sezione 5. Materiali e metodi del kit”
	Consultare il paragrafo Avvertenze e precauzioni nella “Sezione 5. Materiali e metodi del kit”



9. SUPPORTO

In caso di difficoltà nell'utilizzo della modalità SOPHiA DDM™ Dx, consultare la sezione di risoluzione dei problemi del Manuale d'uso della modalità SOPHiA DDM™ Dx disponibile sulla modalità SOPHiA DDM™ Dx o contattare la nostra linea di assistenza al numero di telefono +41 21 694 10 60 o all'indirizzo e-mail support@sophiagenetics.com. Visitare il sito www.sophiagenetics.com per maggiori dettagli. È possibile richiedere assistenza anche tramite web dalla schermata Dashboard nella sezione Supporto della modalità SOPHiA DDM™ Dx.

APPENDICE 1. PIASTRE ADATTATRICI A DOPPIO INDICE

32 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	701-502	701-503	701-504					
B	702-501	702-502	702-503	702-504					
C	703-501	703-502	703-503	703-504					
D	704-501	704-502	704-503	704-504					
E	705-501	705-502	705-503	705-504					
F	706-501	706-502	706-503	706-504					
G	707-501	707-502	707-503	707-504					
H	708-501	708-502	708-503	708-504					



48 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	701-501	703-502	705-503	707-501	709-502	711-503			
B	702-501	704-502	706-503	708-501	710-502	712-503			
C	703-501	705-502	701-504	709-501	711-502	707-504			
D	704-501	706-502	702-504	710-501	712-502	708-504			
E	705-501	701-503	703-504	711-501	707-503	709-504			
F	706-501	702-503	704-504	712-501	708-503	710-504			
G	701-502	703-503	705-504	707-502	709-503	711-504			
H	702-502	704-503	706-504	708-502	710-503	712-504			

96 adattatori a doppio indice compatibili con Illumina® in formato piastra da 96 pozzetti (7 µl ciascuno)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701-501	702-501	703-501	704-501	705-501	706-501	707-501	708-501	709-501	710-501	711-501	712-501
B	701-502	702-502	703-502	704-502	705-502	706-502	707-502	708-502	709-502	710-502	711-502	712-502
C	701-503	702-503	703-503	704-503	705-503	706-503	707-503	708-503	709-503	710-503	711-503	712-503
D	701-504	702-504	703-504	704-504	705-504	706-504	707-504	708-504	709-504	710-504	711-504	712-504
E	701-505	702-505	703-505	704-505	705-505	706-505	707-505	708-505	709-505	710-505	711-505	712-505
F	701-506	702-506	703-506	704-506	705-506	706-506	707-506	708-506	709-506	710-506	711-506	712-506
G	701-507	702-507	703-507	704-507	705-507	706-507	707-507	708-507	709-507	710-507	711-507	712-507
H	701-508	702-508	703-508	704-508	705-508	706-508	707-508	708-508	709-508	710-508	711-508	712-508



i5	Sequenze i5 per foglio campione
D501	TATAGCCT
D502	ATAGAGGC
D503	CCTATCCT
D504	GGCTCTGA
D505	AGGCGAAG
D506	TAATCTTA
D507	CAGGACGT
D508	GTACTGAC

i7	Sequenze i7 per foglio campione
D701	ATTACTCG
D702	TCCGGAGA
D703	CGCTCATT
D704	GAGATTCC
D705	ATTCAGAA
D706	GAATTCGT
D707	CTGAAGCT
D708	TAATGCGC
D709	CGGCTATG
D710	TCCGCGAA
D711	TCTCGCGC
D712	AGCGATAG



APPENDICE 2. ATTREZZATURA DI LABORATORIO USATA NEL LABORATORIO DI SOPHIA GENETICS

MATERIALI FORNITI DALL'UTENTE	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Strisce da 8 provette senza RNasi/DNasi (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific	Provette a scatto EasyStrip	AB-2000
Provette a basso legame con il DNA (1,5 ml)	Axygen	Provette per microcentrifughe MaxyClear	MCT-175-C
Provette (1,5 ml)	Eppendorf	Provette Eppendorf	3810X
Provette coniche (15 ml e 50 ml)	Falcon	Provette coniche per centrifuga da 15 ml e 50 ml	352096 & 352070
Punte filtro	Starlab	TipOne RPT	S1180-3710, S1183- 1740, S1180-8710, S1180-9710, S1182- 1730
Etanolo (grado biologia molecolare)	Merck	Etanolo assoluto	1.00983.1000

ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	Starlab	Mini centrifuga	N2631-0007
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100,

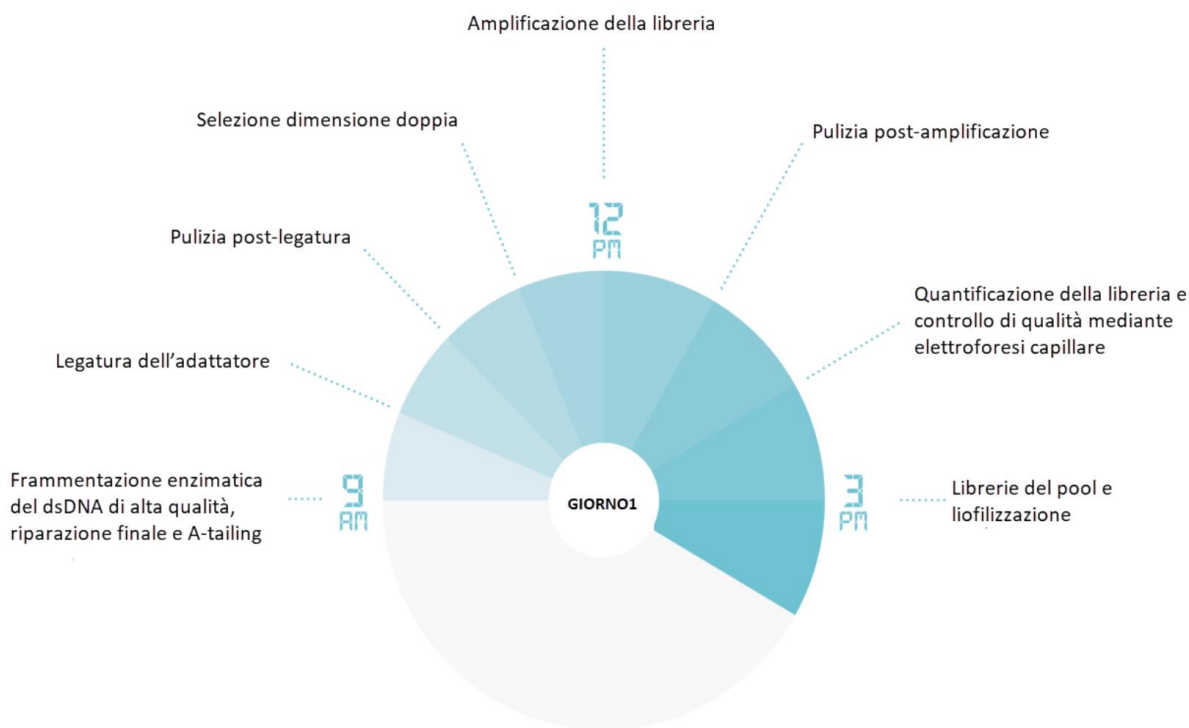


ZONA PRE-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
			S7100-2200, S7100-1000

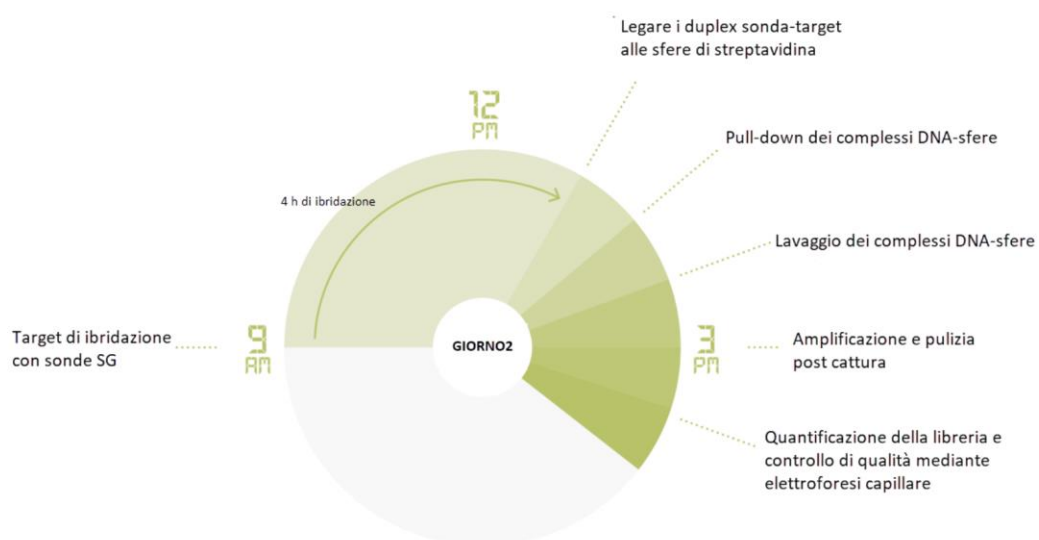
ZONA POST-PCR	FORNITORE	NOME PRODOTTO	N° di CATALOGO
Termociclatore con coperchio riscaldato programmabile	Biometra	TAdvanced 96	
Sistema di elettroforesi capillare	Advanced Analytical	Agilent Fragment Analyzer (Agilent analizzatore frammenti)	
Concentratore di vuoto (SpeedVac™ o simile)	Thermo Fisher Scientific	Savant DNA120-230	
Riscaldatore a blocco secco o bagnomaria (compatibile con provette da 1,5 ml)	Techne	Dri-Block DB-1	
Rack a separazione magnetica (compatibile con provette da 1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific	MagJET Separation Rack (MagJET rack di separazione), 12 provette da 1,5 ml	MR02
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Alpaqua	96S Super Magnet Plate	A001322
Rack a separazione magnetica con 96 pozzetti	Thermo Fisher Scientific	DynaMag-96 Side Magnet (DynaMag-96 magnete laterale)	12331D
Miscelatore a vortice	Grant instrument	Miscelatore a vortice multi-provetta, V32	
Miscelatore a vortice	Scientific Industries	Vortex Genie 2	SI-0236
Microcentrifuga da banco (compatibile con strisce da 8 provette)	StarLab	Mini centrifuga	N2631-0007
Pipette multicanale (P10; P100; P300)	StarLab	ErgoOne	S7108-0510, S7108- 1100, S7108-3300
Attrezzatura e reagente per la quantificazione fluorometrica	Thermo Fisher Scientific	Qubit 3.0 Fluorometer (fluorometro) & Qubit dsDNA HS Assay kit (kit di test)	Q33216 & Q32854
Pipette monocanale (P10; P100; P200; P1000)	StarLab	ErgoOne	S7100-0510, S7100- 1100, S7100-2200, S7100-1000



APPENDICE 3. FLUSSO DI LAVORO GENERALE – SOPHIA DDM™ CAPTURE SOLUTIONS



Preparazione libreria Con SOPHiA GENETICS™ DNA Library Prep Kit I



CATTURA

FLUSSO DI LAVORO FACILE

- SOLO 1-4 PROVETTE DA GESTIRE (LIBRERIE IN POOL MULTIPLEX)
- SOLO 3 ORE DI LAVORO



APPENDICE 4. ELENCO DELLE REGIONI TARGET E DELLE REGIONI SEGNALATE APPLICABILI

REGIONI TARGET*

CROMOSOMA	INIZIO	FINE
1	36931671	36931826
1	36931932	36932534
1	36932805	36932937
1	36933133	36933277
1	36933397	36933588
1	36933650	36933847
1	36934731	36934883
1	36935227	36935466
1	36937008	36937272
1	36937641	36937765
1	36937813	36938017
1	36938092	36938312
1	36939010	36939248
1	36939339	36939513
1	36940952	36941299
1	36945008	36945122
1	43814908	43815055
1	115256395	115256624
1	115258645	115258806
2	25457122	25457314
2	25458550	25458719
2	25459779	25459899
2	25461973	25462109
2	25463145	25463344
2	25463483	25463624
2	25464405	25464601
2	25466741	25466876



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
2	25466998	25467232
2	25467383	25467546
2	25468096	25468226
2	25468863	25468958
2	25469003	25469203
2	25469463	25469670
2	25469894	25470052
2	25470434	25470643
2	25470880	25471146
2	25472500	25472618
2	25475037	25475091
2	25497784	25497981
2	25498343	25498437
2	25505231	25505605
2	25522982	25523137
2	25536756	25536878
2	198266440	198266637
2	198266683	198266879
2	198267254	198267575
2	198267647	198267784
2	198268283	198268513
2	198269774	198269926
2	198269973	198270221
2	209113067	209113409
4	55561652	55561972
4	55589724	55589889
4	55591997	55592241
4	55593358	55593515
4	55593556	55593733
4	55594151	55594312
4	55599210	55599383
4	55602638	55602800



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
4	106155074	106158622
4	106162470	106162611
4	106163965	106164109
4	106164701	106164960
4	106180750	106180951
4	106182890	106183030
4	106190741	106190929
4	106193695	106194100
4	106196179	106197701
5	170834678	170834803
5	170837505	170837594
7	140453049	140453218
7	148504712	148504823
7	148506137	148506272
7	148506376	148506507
7	148507399	148507531
7	148508691	148508837
7	148511025	148511254
7	148511980	148512156
7	148512572	148512663
7	148513750	148513895
7	148514288	148514508
7	148514943	148515234
7	148516662	148516804
7	148523520	148523749
7	148524230	148524383
7	148525806	148525997
7	148526794	148526965
7	148529700	148529867
7	148543536	148543715
7	148544248	148544415
9	5021962	5022238



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
9	5029757	5029931
9	5044377	5044545
9	5050660	5050856
9	5054537	5054909
9	5055643	5055813
9	5064857	5065065
9	5066652	5066814
9	5068996	5069233
9	5069899	5070077
9	5072466	5072651
9	5073672	5073810
9	5077427	5077605
9	5078280	5078469
9	5080203	5080405
9	5080507	5080708
9	5081699	5081886
9	5089648	5089888
9	5090420	5090595
9	5090713	5090936
9	5122978	5123146
9	5126307	5126471
9	5126658	5126816
9	133738124	133738447
9	133747490	133747625
9	133748221	133748449
9	133750229	133750464
9	133753776	133753979
9	133755429	133755569
11	533740	533969
11	534186	534347
11	32410578	32410750
11	32413492	32413635



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
11	32414186	32414326
11	32417777	32417978
11	32421468	32421615
11	119148850	119149032
11	119149194	119149448
12	11803036	11803119
12	11905358	11905538
12	11992048	11992263
12	12006335	12006520
12	12022332	12022928
12	12037353	12037546
12	12038834	12038985
12	12043849	12044005
12	25380142	25380371
12	25398182	25398343
12	112888096	112888341
12	112910722	112910869
12	112915429	112915559
12	112915635	112915844
12	112919852	112920034
12	112924253	112924458
12	112926221	112926339
12	112926802	112927004
13	28592578	28592751
13	28607998	28608153
13	28608193	28608376
13	28608412	28608569
15	90631793	90632004
17	7572901	7573033
17	7573901	7574058
17	7576511	7576682
17	7576827	7576951



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
17	7576993	7577180
17	7577473	7577633
17	7578151	7578314
17	7578345	7578579
17	7579286	7579615
17	7579674	7579746
17	7579813	7579937
17	74732855	74733267
18	42529820	42533330
19	13054501	13054752
19	33792218	33793345
20	31019360	31019507
20	31021061	31021745
20	31022209	31025166
21	36164406	36164932
21	36171572	36171784
21	36193939	36194018
21	36206681	36206923
21	36231745	36231900
21	36252828	36253035
21	36259114	36259434
21	36265196	36265285
21	36421113	36421221
21	44514739	44514923
21	44524399	44524537
X	15808593	15808684
X	15809031	15809161
X	15817969	15818101
X	15821785	15821944
X	15822208	15822345
X	15826330	15826419
X	15827297	15827466



CROMOSOMA	INIZIO	FINE
X	15833774	15834038
X	15836684	15836790
X	15838304	15838464
X	15840828	15841390

*Una regione target è la posizione in cui la pipeline riporterà le varianti ad alta attendibilità quando sono presenti. Le coordinate sono basate su 1 e la coordinata finale è inclusa nella regione.

REGIONI CONTRASSEGNALE APPLICABILI**

CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE	GENE_EXON
1	36933564	36933584	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CSFR3_ ex14
17	7572977	7573010	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	TP53_ ex11
18	42533111	42533125	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	SETBP1_ ex04
21	36206686	36206787	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	RUNX1_ ex07
2	198267762	198267783	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	SF3B1_ ex13
5	170837510	170837526	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	NPM1_ ex11
9	5126453	5126462	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	JAK2_ ex24
11	119149355	119149373	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere	CBL_ ex09



CROMOSOMA	INIZIO	FINE	DESCRIZIONE	GENE_ EXON
			confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	
19	33792754	33792775	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CEBPA_ ex01
19	33793007	33793041	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	CEBPA_ ex01
20	31022441	31022449	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti di sequenziamento se viene utilizzata la chimica Illumina® V2	ASXL1_ ex12
7	148543693	148543705	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	EZH2_ ex41
17	74733013	74733013	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali	SRSF2_ ex1
20	31022262	31022262	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali che causano letture chimeriche	ASXL1_ ex12
18	42531410	42531410	Le varianti in questa regione con una frazione di variante inferiore al 10% possono essere confuse da artefatti sperimentali che causano letture chimeriche	SETBP1_ ex04
12	112919878	112920009	Questa regione è altamente omologa	PTPN11_ ex10

**Una regione contrassegnata è una regione che si sovrappone a un esone e potrebbe causare incertezze nella chiamata delle varianti, ad esempio per i seguenti motivi: bassa complessità, rumorosa, pseudogena, ecc. Potrebbe dipendere dalla tecnologia di sequenziamento. Una variante rilevata in questa regione non verrà classificata con bassa attendibilità in SOPHiA DDM™ Dx, ma le verrà associato un triangolo di avvertenza e verrà reso disponibile un messaggio di avvertenza dettagliato corrispondente nella scheda delle avvertenze. La colonna del filtro della variante corrispondente nella tabella finale della variante completa non verrà contrassegnata a causa di questa regione. Le coordinate sono basate su 1 e la coordinata finale è inclusa nella regione.



Document Approvals
Approved Date: 28 Jan 2026

Approval Verdict: Approve	Coleman Spence, (cspence@sophiagenetics.com) Regulatory Approval 28-Jan-2026 01:07:07 GMT+0000
QA Approval Verdict: Approve	Claire Mullane, (cmullane@sophiagenetics.com) Quality Assurance Approval 28-Jan-2026 08:55:10 GMT+0000